

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
**Image Problem Mailbox.**





Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(19)

(11) Numéro de publication:

0 041 935

A1

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 81870028.8

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: C 07 D 519/04  
A 61 K 31/395

(22) Date de dépôt: 09.06.81

(30) Priorité: 10.06.80 LU 82514  
23.12.80 LU 83034

(71) Demandeur: OMNICHEM Société anonyme  
12 Avenue de Broqueville  
B-1150 Bruxelles(BE)

(43) Date de publication de la demande:  
16.12.81 Bulletin 81/50

(72) Inventeur: Trouet, André Benoit Léon  
29 Predikherenberg  
B-3900 Winksele(BE)

(84) Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

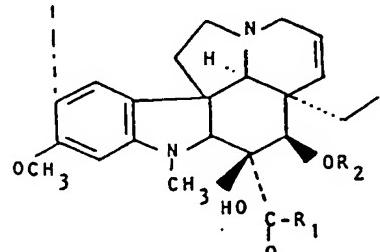
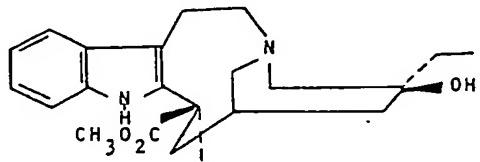
(72) Inventeur: Rao, Kandukuri Sivaprasada Bushana  
11 rue Kwakambienne  
B-1331 Rosières(BE)

(72) Inventeur: Hannart, Jean Alfred Alphonse  
25 avenue d'El Pirere  
B-1302 Dion Valmont(BE)

(54) Dérivés n-(vinblastinoyl-23) d'acides aminés et de peptides, leur préparation et leur application thérapeutique.

(57) Dérivés de couplage de la vinblastine avec des acides aminés ou des peptides, de formule générale

lien amide, leur procédé de préparation à partir de la vinblastine et leur application en thérapeutique. Ils sont plus particulièrement utilisés en tant qu'agent anti-tumoral.



EP 0 041 935 A1

dans laquelle R<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupe acétyle et R<sub>1</sub> représente un reste acide aminé ou peptide estérifié rattaché au groupe vinblastinoyl-23 par un

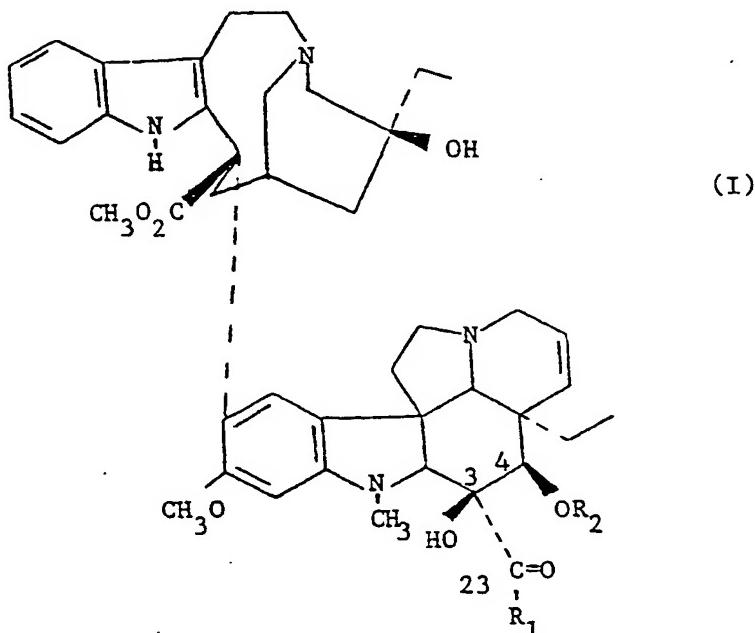
Dérivés N-(vinblastinoyl-23) d'acides aminés et de peptides, leur préparation et leur application thérapeutique.

La présente invention se rapporte à de nouveaux alcaloïdes bis-indoliques. Plus particulièrement, l'invention est relative à de nouveaux dérivés de couplage d'acides aminés avec la vinblastine, y compris des dérivés peptidiques, à leur procédé de préparation, à 5 leur application en tant qu'agents antitumoraux et aux compositions pharmaceutiques les contenant.

Ces nouveaux dérivés de la vinblastine peuvent être utilisés pour le traitement des leucémies et des tumeurs malignes chez l'homme.

10 Les alcaloïdes bisindoliques du type de la vinblastine sont des composés bien connus possédant le squelette carboné de la formule générale suivante :

15



20

On citera à titre d'exemple la vincleukoblastine (brevet américain 3 097 137), la leurocristine ou vincristine et la 25 leurosidine (brevet américain 3 205 220), le vinglycinate (brevet belge 659 112) et la vindésine (brevet belge 813 168). Ce dernier composé a été obtenu par transformation chimique de la vinblastine naturelle ( $I, R_1=OCH_3, R_2=COCH_3$ ), qui elle-même est obtenue par extraction à partir de feuilles de Catharanthus roseus.

La vinblastine, la vincristine et la vindésine sont commercialisées pour leur utilisation en thérapeutique humaine, plus particulièrement pour le traitement de leucémies et de certaines tumeurs solides.

5 Ces médicaments possèdent néanmoins des effets secondaires défavorables. La vincristine est neurotoxique et la vinblastine est fortement toxique au niveau des tissus hématopoétiques.

Leur mécanisme d'action est analogue à celui qui a été postulé pour l'action antimitotique de la colchicine. Ces médicaments 10 agiraient par inhibition de la polymérisation de la tubuline en microtubules et arrêt subséquent de la division cellulaire en métaphase.

L'utilisation de complexes 1:1 d'alcaloïdes bisindoliques antitumoraux avec la tubuline a été décrite dans le brevet belge 854 053.

15 Dans certains cas, il peut en résulter une toxicité moindre et une activité chimiothérapeutique plus importante que celles des alcaloïdes libres correspondants.

D'autres dérivés obtenus par modification chimique de la vinblastine ont été testés. Ainsi le sulfate de vinglycinate 20 (I, sulfate,  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=COCH_2N(CH_3)_2$ , Cancer Research 1967, 27, 221-227) a été étudié en expérimentation clinique mais ne s'est généralement pas révélé supérieur à la vinblastine et à la vincristine.

Le brevet belge 813 168 décrit la vindésine (I,  $R_1=NH_2$ ,  $R_2=H$ ) et d'autres dérivés carboxamide en C<sub>3</sub> de la vinblastine. Des 25 publications postérieures ont confirmé l'intérêt thérapeutique de la vindésine ou carboxamide-3 déacétyl-0-4 vinblastine, mais ce composé s'est cependant révélé inactif pour le traitement de tumeurs L 1210 transplantées chez la souris (C.J. Barnett et al., J. Med. Chem., 21, 88, 1978).

30 Les dérivés de couplage d'acides aminés avec la vinblastine et d'autres alcaloïdes bisindoliques analogues ont été proposés d'une manière générale dans le brevet belge 813 168 susmentionné.

Néanmoins, aucun exemple de dérivé d'acide aminé spécifique n'a été divulgué et, conséquemment, aucune donnée physico-chimique n'a été fournie. Aucune méthode de préparation spécifique et aucun résultat pharmacologique particulier n'a été mentionné.

Il peut donc en être déduit que ces dérivés n'ont pas été réellement synthétisés et/ou n'ont pas été testés pour leur activité antitumorale.

Page 3, ligne 10 et suivantes, il est en outre mentionné que "l'activité anti-néoplasique semble être limitée à des structures très spécifiques et les chances d'obtenir des médicaments plus actifs en modifiant ces structures semblent également faibles".

Il a maintenant été constaté que les nouveaux composés décrits dans la présente invention sont capables de retarder efficacement la mort de souris auxquelles on a transplanté par voie intraveineuse des tumeurs P 388 et L 1210.

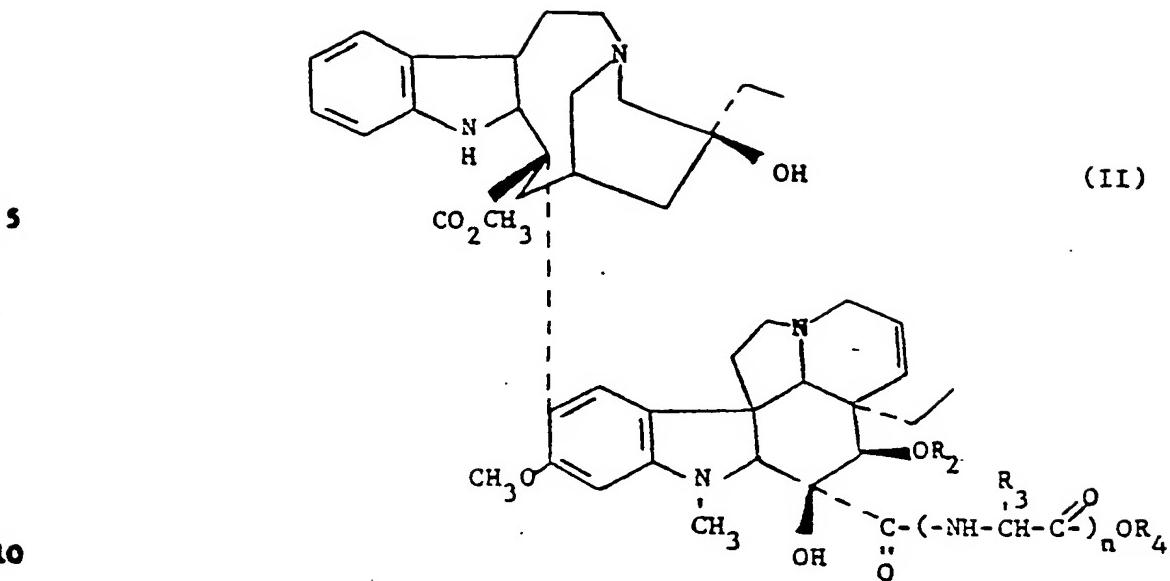
Alors que les alcaloïdes Vinca administrés par voie intraveineuse ne présentent généralement aucune activité sur la leucémie L 1210, les résultats obtenus montrent pour les nouveaux dérivés une activité très significative et inattendue.

Les activités sur les tumeurs expérimentales P 388 se sont également révélées, de manière surprenante, très supérieures à celles des alcaloïdes Vinca de référence. De nombreuses rémissions complètes ont été observées.

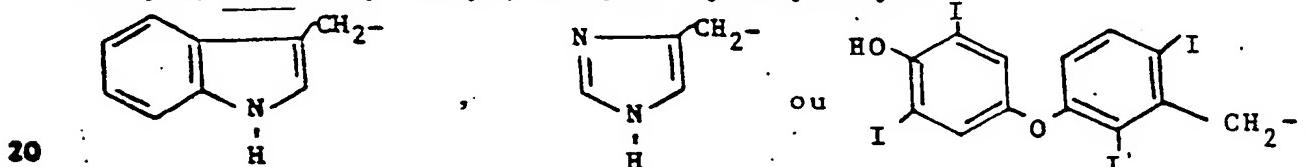
Les dérivés de l'invention possèdent en outre d'autres avantages importants et inattendus comparativement à la vinblastine et à ses analogues connus, en particulier la vindésine.

En particulier, les toxicités observées sont généralement inférieures à celles correspondant à la vindésine ou à la vincristine.

Les nouveaux composés de l'invention répondent plus particulièrement à la formule générale II



15 dans laquelle  $R_2$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe acyle comportant de 2 à 9 atomes de carbone ;  $R_3$  représente chaque fois indépendamment, un atome d'hydrogène, un groupe alkyle ramifié ou non comportant de 1 à 8 atomes de carbone, un groupe hydroxy C1-C8 alkyle, amino-hydroxy C1-C8 alkyle, carboxy-C1-C8 alkyle, amido C1-C8 alkyle, guanadino C1-C8 alkyle, amino C1-C8 alkyle, thiol C1-C8 alkyle cystéinyl méthyle, thiométhyl-éthyl, benzyle, hydroxybenzyle



ou  $R_3$  représente avec l'atome de carbone auquel il est attaché et l'azote du groupe amide, un cycle azole ou hydroxyazole ;  
■ varie de 1 à 6 ;  
et  $R_4$  représente un groupe alkyle, linéaire ou ramifié possédant de 25 1 à 8 atomes de carbone, ou un groupe benzyle.  
 $COOR_4$  représente de préférence un groupe carboéthoxy ou carbométhoxy.

Plus particulièrement, le fragment structural de la formule II



représente un radical de n'importe lequel des acides aminés naturels et de leurs isomères optiques de configuration D, notamment :

la glycine	acide aspartique	cystine
alanine	acide glutamique	méthionine
valine	asparagine	phénylalanine
leucine	glutamine	tyrosine
5      isoleucine	arginine	tryptophane
sérine	lysine	proline
thréonine	cystéine	histidine
hydroxyproline      ou      hydroxylysine.		

On peut considérer ces composés comme étant des dérivés  
 10 de la descarbométhoxy-3 désacétyl-0-4 vinblastine carboxamide-3. On préférera cependant les désigner comme étant des dérivés N-(vinblastinoyl-23) d'acide aminé.

Les composés préférés de l'invention répondent à la formule II dans laquelle R<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène et la  
 15 partie acide aminé est dérivée d'un des acides aminés suivants : L ou D tryptophane, leucine, valine, isoleucine, alanine et phénylalanine. Parmi ces derniers, le L-tryptophane, la L-isoleucine et la L-alanine se sont révélés plus particulièrement intéressants.

Parmi les dérivés d'esters peptidiques, les composés  
 20 préférés répondent à la formule II dans laquelle n=2 et les acides aminés sont choisis dans la liste mentionnée ci-dessus, suivant n'importe quelle séquence.

En ce qui concerne les propriétés pharmacologiques, il est prévisible que de légères modifications de la structure du squelette peptide fourniront des composés d'activité comparable.  
 25

En particulier, la présence d'un acide  $\alpha$ -aminé non naturel (par exemple la norleucine, un acide  $\alpha$ -aminé N-monosubstitué ou un acide aminé  $\alpha,\alpha$ -dialkyle) fournirait des composés d'activité similaire contre un certain nombre de tumeurs.

30      Pareils composés entrent donc dans le cadre de la présente invention.

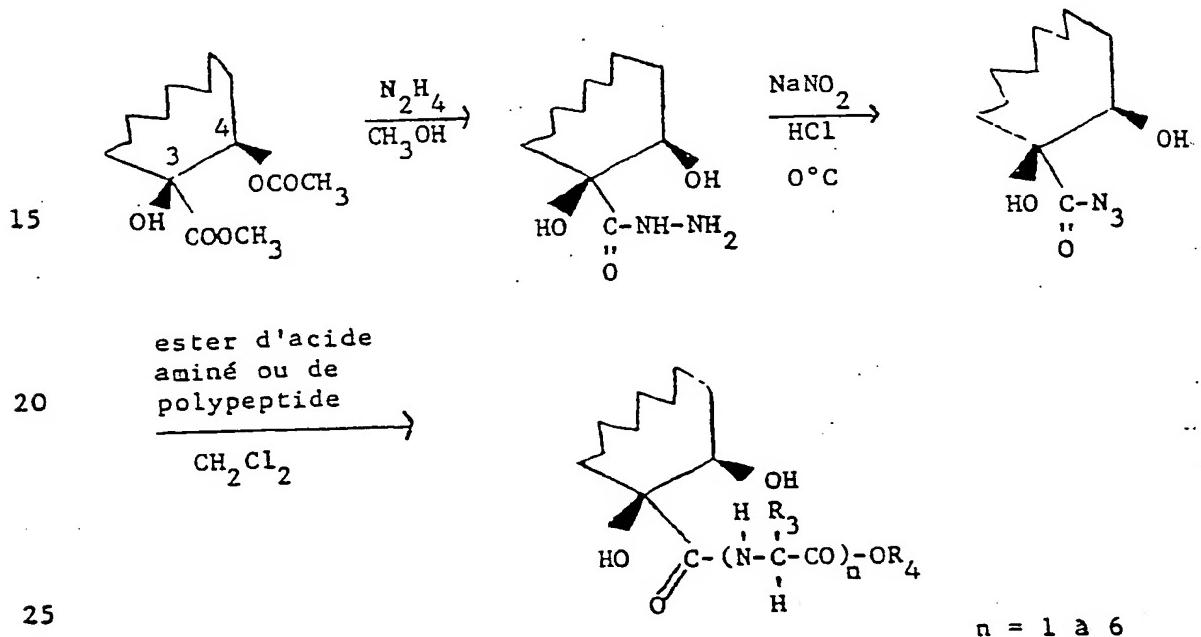
Les nouveaux dérivés bisindoliques de l'invention sont obtenus à partir de la vinblastine par hydrazinolyse, nitrosation puis couplage avec l'ester d'acide aminé ou de polypeptide approprié.

35      Lorsque l'acide aminé ou le peptide contient des groupes fonctionnels dans la chaîne latérale R<sub>3</sub> (formule II), comme la lysine

ou la cystéine, il peut être nécessaire de protéger ces groupes fonctionnels en utilisant les méthodes bien connues de l'homme de l'art.

Cette protection peut être effectuée, selon la nature du groupe à protéger, par le greffage d'un groupe benzyle, t-butyle, benzyloxy-carbonyle, t-butoxycarbonyle, trifluoroacétyle ou trityle. D'autres agents bien connus en chimie peptidique peuvent être avantageusement utilisés.

Selon le procédé mentionné ci-dessus, les composés suivant l'invention peuvent être obtenus à partir de la vinblastine, de manière classique, par hydrazinolyse suivie de nitrosation, puis couplage avec l'ester d'acide aminé ou de peptide selon le schéma réactionnel I



La première étape consiste à additionner un excès d'hydrazine anhydre à une solution de vinblastine base dans le méthanol anhydre. Le mélange réactionnel est alors chauffé sous atmosphère inertie pendant 12 à 30 heures à une température comprise entre 30 et 30 70°C. De préférence, la température sera maintenue vers 60°C, le temps de réaction étant alors de 24 heures.

L'hydrazide de la désacétyl-4-vinblastine est alors isolé par addition d'eau, extraction au dichlorométhane et concentration. Le composé peut être ultérieurement purifié par chromatographie préparative (silice neutre).

Lors de la deuxième étape, la fonction hydrazide de la vinblastine modifiée est transformée en azoture d'acide. Cette transformation est effectuée de manière connue, par addition de nitrite de sodium à l'hydrazide en solution dans un mélange eau-méthanol-acide.

5 L'acide utilisé peut être l'acide chlorhydrique.

La température de réaction est maintenue entre 0 et 5°C. Après extraction par un solvant aprotique non soluble dans l'eau, de préférence le chlorure de méthylène, la phase organique est partiellement concentrée.

10 L'azoture d'acide lui-même n'est de préférence pas isolé, mais directement mis en présence de l'ester d'acide aminé ou de polypeptide ou, le cas échéant, le dérivé correspondant protégé, en solution dans le chlorure de méthylène.

15 La quantité d'acide aminé mise en œuvre est de 1 à 5 équivalents de vinblastine carboxazide.

Le milieu réactionnel est maintenu entre -3 et +10°C pendant 8 à 72 heures, le plus souvent environ 15 heures. La réaction est facilement suivie par chromatographie sur couche mince. Après concentration, on isole le composé de l'invention II qui peut être 20 transformé en sulfate ou un autre sel d'acide minéral ou organique par cristallisation à partir d'une solution méthanolique de l'acide correspondant.

Les composés de l'invention sont purifiés en utilisant les techniques bien connues de chromatographie et de recristallisation.

25 Le cas échéant, le dérivé de désacétyl-*O*-4 vinblastine ainsi obtenu peut être réacétylé soit directement pour donner le dérivé de la vinblastine II dans lequel R<sub>2</sub>=COCH<sub>3</sub> (J. Med. Chem. 22, 391, 1979) ou par formation préliminaire du dérivé diacétoxy-3,4 suivie d'une hydrolyse sélective du groupe acétoxy en position 3. Le 30 groupe hydroxyle en C<sub>4</sub> peut être, de manière connue en soi, estérifié par d'autres dérivés activés d'acides comportant de 2 à 9 atomes de carbone.

La présente invention s'étend également aux applications industrielles et notamment pharmaceutiques des composés bisindoliques nouveaux.

Les composés de l'invention présentent en particulier des propriétés antitumorales particulièrement intéressantes et susceptibles d'être utilisées en thérapeutique humaine.

Ces dérivés d'acide aminé peuvent être, en particulier, 5 utilisés pour le traitement des leucémies du type L 1210, P 388, de gliomes, lymphosarcomes et d'autres leucémies ou tumeurs malignes.

En thérapeutique humaine, ils sont utilisés pour le traitement de la maladie de Hodgkin et pour d'autres tumeurs pouvant bénéficier d'un traitement avec la vinblastine, la vincristine et la 10 vindésine.

Ces composés peuvent également être utilisés en médecine vétérinaire pour le traitement des tumeurs chez les animaux.

D'autres applications thérapeutiques intéressantes peuvent être envisagées pour ces nouveaux dérivés d'alcaloïdes bisindoliques. Il a en effet été relevé que la vinblastine pourrait être utilisée dans le traitement de certaines arthrites (brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 4 208 411) et la vincristine pour le traitement de psoriasis (brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 749 784). L'activité anti-virale de certains alcaloïdes bis-indolique a également été 20 relevée.

Pour le traitement des tumeurs malignes chez les animaux, les activités chimiothérapeutiques ont été testées en utilisant les sels de sulfate des composés de l'invention.

Des souris DBA<sub>2</sub>, femelles de souche Charles River France 25 ont été inoculées par voie intraveineuse avec  $10^4$  cellules leucémiques provenant d'une ascite leucémique P 388 ou L 1210 de sept jours. Le jour 0 est le jour d'inoculation des cellules tumorales. Le composé de l'invention (sous forme sulfate) est alors injecté par voie intraveineuse en solution dans l'eau physiologique (NaCl 9/1000) suivant 30 le schéma en une injection (jour 1) ou le schéma en trois injections (jours 1, 2 et 3). On calcule alors le MST (Median Survival Time), jour où la moitié des animaux sont morts.

Ce calcul est effectué le trentième jour.

Le pourcentage d'ILS (Increased Life Span) ou pourcentage d'augmentation de survie est calculé à l'aide de la formule suivante : 35

$$\% \text{ ILS} = \left( \frac{\text{MST produit}}{\text{MST contrôles}} \times 100 \right) - 100$$

Le nombre de souris survivant au trentième et au soixantième jour est également indiqué.

A des doses trop toxiques, le pourcentage d'ILS devient négatif, c'est-à-dire que les souris non traitées survivent plus longtemps que celles ayant été injectées par la substance antitumorale.

Dans certains cas, les ILS observés dépendent de la variété de souris utilisée (DBA<sub>2</sub>, France ou Etats-Unis d'Amérique).

Les résultats obtenus sont à comparer à ceux observés avec la vinblastine (VLB), la vindésine (VDS) et la vincristine (VCR) dans le tableau I ci-après. La supériorité pharmacologique des composés de l'invention est ainsi démontrée (tableaux II à XI ci-après).

Le tableau II fournit les résultats obtenus avec quelques dérivés de la leucine naturelle. Les dérivés suivants ont ainsi été testés :

VLE : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate d'éthyle  
VLM : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate de méthyle.

Le tableau III rassemble les résultats obtenus avec un dérivé de la D-leucine, en l'occurrence le N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23) D-leucinate d'éthyle (VDLE).

Les résultats obtenus avec les dérivés suivants du L-tryptophane sont repris dans le tableau IV :

V-Trypt E : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle, MST calculé à 30 et à 60 jours ;

V-Trypt M : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate de méthyle.

Le tableau V présente les activités observées avec le dérivé du tryptophanate d'éthyle de configuration absolue D (VD Trypt E).

Les tableaux VI à XI reprennent les résultats obtenus avec les composés suivants :

VAE : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-alaninate d'éthyle (tableau VI)

VPE : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-phénylalaninate d'éthyle (tableau VII)

VILE : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-isoleucinate d'éthyle (tableau VIII)

VILM : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-isoleucinate de méthyle (tableau VIII)

VVE : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-valinate d'éthyle

(tableau IX)

V-Tyr E : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tyrosinate d'éthyle

(tableau X)

5 V-Val-Trypt E : N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-valinyl-L-tryptophanate d'éthyle (tableau XI).

T A B L E A U I

VINBLASTINE (VLB)

P 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
4	1	10	14,6	36,4	0	0
6	1	10	15,6	45,8	0	0
8	1	9	18,5	72,9	0	0

VINDESINE (VDS)

P 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
2	1	10	13,6	27,1	0	0
3	1	10	14	30,8	0	0
4	1	10	14,8	38,3	0	0
5	1	10	13,8	30,2	0	0
6	1	10	14	32	0	0

L 1210

3	1	20	8,7	5	0	0
---	---	----	-----	---	---	---

T A B L E A U I (suite)

VINCRISTINE (VCR)

P 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
5	0,5	10	11,56	4	0	0
	1	19	12,32	15	0	0
	1,5	20	12,78	19	0	0
	2	10	6	- 46	0	0

L 1210

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
10	0,5	10	7,56	1	0	0
	1	20	7,91	5	0	0
	1,5	20	8,38	12	0	0
	2	10	8,67	16	0	0

T A B L E A U I I

DERIVES DE LA LEUCINE NATURELLE

VLEP 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
20	20	10	16	52,4	2	1
	22	10	20	90,5	4	1
	24	20	18	65	2	0
	26	10	17,5	53,5	1	0
25	28	10	19,6	71,9	1	1
	30	10	21	84,2	2	1
	34	10	6	-48	2	1
	36	10	5,4	-53	1	1
30	5	9	14,5	25	0	0
	6	10	15	29,3	0	0
	7	10	14,2	24,6	0	0
	9	10	5	-56	1	1
	12	9	4,8	-59	0	0

T A B L E A U   I I   (suite)VLMP 388

	Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	>30 j	>60 j
5	10	1	20	16,7	41	2	1
	10,5	1	10	16,4	53,3	0	0
	11	1	19	17,7	51	2	1
	11,5	1	10	16,8	57	0	0
	12	1	20	17,5	49	3	2
10	12,5	1	30	17,3	49	8	3
	13	1	20	20,5	74	7	5
	15	1	10	18	55,2	4	1

L 1210

15	10,5	1	10	10,6	24,7	0	0
	11,5	1	10	10,8	27	0	0
	12,5	1	10	10	17,6	0	0

T A B L E A U   I I IVDLEP 388

	Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	>30 j	>60 j
20	6	1	10	14,7	26,7	0	0
	8	1	10	17	46,5	2	1
	10	1	20	28,5	146	9	2
	11	1	10	16	49,5	1	0
	12,5	1	10	30	145,9	6	3

L 1210

9	1	10	10,8	27	0	0
10	1	10	11	29,4	0	0

T A B L E A U I VV-Trypt-EP 388

	Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	>30 j	>60 j
5	20	1	10	11,4	43,9	0	0
	40	1	10	17	58,8	5	4
	50	1	20	24,5	117	9	5
	55	1	60	41	279	39	25
	60	1	100	33	202	57	36
	65	1	29	22,75	114	13	9
10	70	1	20	6,5	-39	8	5

L 1210

	55	1	30	11,8	56	0	0
	60	1	30	12,5	65	2	2
15	65	1	30	12	62	0	0
	70	1	10	12,3	61,8	1	1

P 388 (ILS calculé au jour 60)

	Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 60 j	ILS %	>30 j	>60 j
20	55	1	30	60	457	28	16
	60	1	60	36	224	52	24

V-Trypt-MP 388

	Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	>30 j	>60 j
25	30	1	10	15	33,9	0	0
	40	1	10	16	42,8	0	0
	50	1	10	23,5	199,8	1	0
	60	1	20	26	140	7	2
	70	1	10	26	145,3	5	

L 1210

50	1	10	11,5	47,4	0	0
55	1	10	12,5	60,2	0	0

T A B L E A U VVD-Trypt-EP 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	>30 j	>60 j
10	20	1	10	13,3	18,7	0
	30	1	10	15,8	41,4	1
	40	1	20	16,5	52	1
	50	1	10	22	107,5	1
	60	1	10	4,4	-60,7	1

15

L 1210

40	1	10	9,5	21,8	0	0
45	1	10	10,5	34,6	0	0

20

T A B L E A U VIVAEP 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	>30 j	>60 j
25	5	1	10	14,8	27,6	0
	10	1	10	16,3	40,5	0
	12,5	1	19	16,2	44	1
	15	1	20	17	46	5
	25	1	10	19	63,8	2

30

L 1210

12,5	1	20	10,4	48	0	0
------	---	----	------	----	---	---

T A B L E A U   V I IVPEP 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	30 j	60 j
5	10	10	13	12,1	0	0
	20	10	14,4	24,1	0	0
	40	10	30	158,6	7	7
	50	30	13,6	26	10	7
	55	10	14,6	36,4	1	0

10

L 1210

15	55	1	10	8,5	0	0	0
	60	1	10	9	13,9	0	0
	65	1	10	8,8	3,5	0	0
	70	1	20	8,7	13	0	0
	75	1	10	9,5	25	0	0

T A B L E A U V I I IVILEP 388

5	Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
	8	1	30	30	172	- 20	2
		9	20	30	179	12	

L 1210

8	1	20	11,57	58	0	0
9	1	10	12,8	68,4	0	0

10 VILMP 388

15	Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
	3	1	10	16,4	41,3	0	0
		5	29	18,2	68	8	3
		6	69	23,4	115	25	6
		7	30	30	177	16	5
		9	10	6	-48,3	4	4

L 1210

6	1	29	11,2	60	0	0
---	---	----	------	----	---	---

T A B L E A U I XVVEP 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
5	5	10	13,6	17,2	0	0
	10	10	17,8	53,4	0	0
	12,5	10	21	82,6	2	0
	14	20	21	98	3	
	15	39	23,5	107	14	4
10	17,5	9	8,4	-22,2	0	0
	25	10	6,5	-44	0	0

L 1210

15	1	19	11,4	61,9	0	0
----	---	----	------	------	---	---

T A B L E A U XV-Tyr EP 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
20	20	10	13,9	29,9	0	0
	40	10	16,4	53,3	1	1
	50	10	16	49,5	1	1
	60	10	16	49,5	3	2
	70	10	5,4	-49,5	0	0

T A B L E A U X IV-Val-Trypt EP 388

Dose mg/kg/j	Schéma	Nombre d'animaux	MST max 30 j	ILS %	> 30 j	> 60 j
30	15	10	26	132,1	3	0
	25	10	27,5	145,5	3	2
	35	19	27,5	154	8	4
	45	10	30	183	8	4
	50	9	27,5	145,5	4	3

## TABLEAU XIII

P 388 injectée par la voie intrapéritonéale  
BDF1 femelles Charles River, France

5	Produit	Dose mg/kg/i	Schéma	Nombre d'animaux	MST *	ILS * %	Pourcentage de survivants au jour 30
							nombre total d'animaux
10	VCR	2,7	1	11	15,6	64,2	0
	V-Trp-E	50	1	10	22	131,6	1
	V-Trp-E	60	1	10	31	226	6
	V-Trp-E	80	1	10	21,5	126,3	0

Activité du V-Trp-E et de VCR sur la leucémie P 388 implantée en i.p. chez des souris BDF1 femelles. Des souris BDF1 femelles reçoivent  $10^6$  15 cellules leucémiques au jour 0.

Au jour 1, les produits sont administrés par voie i.p. aux doses précisées.

MST \* = Median Survival Time = jour moyen de survie

7. ILS \* = Increase in Life Span = % d'augmentation de la durée de 20 survie.

"Lewis Lung Carcinoma" (3LL)

$1,1 \times 10^6$  cellules tumorales sont injectées intramusculairement dans la patte postérieure droite de souris C57Bl femelles.

Les drogues sont administrées par voie intraveineuse 25 suivant un schéma en 3 injections.

Les animaux sont sacrifiés le 23e jour après la greffe. Le poids de la tumeur primaire est estimé en grammes ; les métastases pulmonaires sont comptées et leur diamètre mesuré. Le poids des métastases est évalué en supposant qu'il s'agit de sphères de densité égale 30 à 1 ; le nombre de souris sans métastase est également relevé.

Le tableau XIII reprend les résultats obtenus. Les produits présentent une activité sur la tumeur primaire.

Le poids moyen des métastases, leur nombre moyen ainsi que le nombre de souris sans métastase sont indiqués et permettent de juger l'activité anti-métastasique des composés antitumoraux administrés.

## TABLEAU XIII

Produit 5	Dose mg/kg/j	Nombre de souris disséquées	Poids de la tumeur (g)	Poids des métastases (mg)	Nombre moyen de métastases	Nombre de souris sans métastase
			$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
-	-	20	9,64	0,916	27,61	54,53
VDS	2,5	22	5,72	0,698	0,40	0,91
VTrypE	50	21	4,83	0,868	0,047	0,038
					28,4	15,22
					13,68	7,49
					4,58	2,83
						0
						0
						2

Des souris C57Bl femelles reçoivent, au jour 0  $1,1 \times 10^6$  cellules tumorales par voie intramusculaire. Aux jours 1, 8 et 15, les drogues sont administrées aux doses indiquées. Le 23e jour les souris sont sacrifiées ; la tumeur primaire est pesée, les métastases pulmonaires sont numérotées et leur diamètre est mesuré.

Les activités antitumorales rassemblées dans les 15 tableaux I à XII confirment l'efficacité inattendue des dérivés d'acides aminés de la présente invention. La plupart des dérivés se révèlent effectivement être supérieurs à la vindésine, tant pour les tumeurs injectées par voie i.v. que par voie i.p. (tableau XII).

L'activité exceptionnelle de ces dérivés sur les tumeurs L 1210 est 20 démontrée.

Il y a lieu de noter que, parmi les tumeurs expérimentales actuellement accessibles, la leucémie L 1210 est reconnue comme étant une des tumeurs expérimentales les plus significatives pour la sélection de médicaments antitumoraux chez l'homme.

25 Le tableau XIII reprend les résultats obtenus à l'occasion d'un test antimétastasique. L'activité du dérivé VLB-Trypt-E se révèle très supérieure à celle de la vindésine. L'efficacité sur la tumeur primaire est en outre comparable à celle de la vindésine.

On notera en particulier l'activité exceptionnelle du 30 sulfate de N-(désacétyl-O-4 vinblastinoyl-23) tryptophanate d'éthyle qui a fourni un ILS calculé à 60 jours (P 388) de 457% avec la moitié des souris survivant plus longtemps. La dose optimale se situerait alors aux environs de 60 mg. Par contre, les dérivés d'acides aminés qui ont été testés sous la forme amide ou acide ne présentent que des

activités faibles ou non significatives. Ces dérivés peuvent cependant être utilisés comme intermédiaires utiles pour l'obtention d'autres alcaloïdes bisindoliques très actifs.

En général, les composés de l'invention se sont révélés 5 être beaucoup moins toxiques que les alcaloïdes Vinca actuellement utilisés en thérapeutique anticancéreuse. La dose létale 50 ( $DL_{50}$ ) de la VLE a été déterminée en utilisant des souris femelles de souche Charles River CD<sub>1</sub> et pesant au moins 24 g. La méthode de calcul de Litchfield et Willcoxon fournit une valeur de  $DL_{50}$  de 32 mg/kg.

10 Les doses correspondantes pour la vinblastine et la vindésine sont respectivement de 24 mg/kg et environ 11 mg/kg. On a noté en particulier contrairement aux cas de la vinblastine et de la désacétyl vinblastine, l'absence de toxicité hépatique à des doses de 20 à 40 mg/kg.

15 Les toxicité aiguës du V-Trp-E et du VILE ont été également déterminées sur des souris NMRI femelles. Les valeurs suivantes ont été obtenues : V-Trp-E : 100,8 mg/kg, VILE : 17,7 mg/kg à comparer avec les valeurs correspondantes de la vinblastine et de la vindésine, c'est-à-dire respectivement 27,4 et 13,8 mg/kg. Le V-Trp-E est donc 20 nettement moins毒 que la VLB ou la VDS.

Pour leur application thérapeutique, les composés de l'invention, éventuellement sous forme lyophilisée, peuvent être utilisés par la voie orale ou par administration parenterale. 25 par exemple par voie intra-veineuse, dissous dans un diluant pharmaceutiquement acceptable, sous la forme d'une base ou d'un sel d'addition d'un acide pharmaceutiquement acceptable. Parmi ces sels d'addition, on préférera les sels non toxiques tels que les sels d'acides minéraux comme l'acide chlorhydrique, l'acide phosphorique et l'acide sulfurique, ou d'acides organiques 30 comme l'acide acétique, propionique, succinique, tartrique, oxalique, méthanesulfonique, benzènesulfonique.

L'eau physiologique ou d'autres solutions salines tamponnées, par exemple avec un phosphate, sont des solvants appropriés. D'une manière générale, ces composés peuvent être utilisés en s'inspirant des techniques et des limitations qui sont connues pour les traitements thérapeutiques avec les autres alcaloïdes de la classe des Vinca.

La substance active est généralement administrée à une posologie pouvant varier de 0,01 mg à environ 5 mg/kg, en fonction du dérivé utilisé et du schéma thérapeutique adopté. Les doses hebdomadaires totales varieront généralement de 0,1 mg à environ 35 mg/kg.

5 Les compositions selon l'invention sont présentées sous des formes d'administration contenant le principe actif à la dose unique de 2 à 900 mg.

Les composés de l'invention peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec un ou plusieurs agents carcinostatiques incluant 10 par exemple les agents alkylants, les antimétabolites tels que le méthotrexate, le fluoro-5-uracile, la mercapto-6 purine, la thio-6 guanine, les arabinosides de la cytosine et les antibiotiques tels que l'actinomycine D, la daunorubicine, l'adriamycine, et le cis-diamino-dichloro-platine. En particulier, ces nouveaux dérivés de la vinblastine peuvent être utilisés en association entre eux.

15 Les exemples suivants illustrent de manière non limitative le procédé conduisant aux composés de l'invention.

Mode opératoire général pour l'obtention de dérivés N-(désacétyl-0-4-vinblastinoyl-23) d'acides aminés.

20 1 g ( $1.3 \cdot 10^{-3}$  M) de descarbométhoxy-3-désacétyl-0-4-vinblastine carboxhydrazide-3 est solubilisé dans 23 ml de méthanol absolu et 74 ml d'acide chlorhydrique 1N. Cette solution est alors refroidie à -10°C et 207 mg de nitrite de sodium y sont ajoutés en une fois.

25 Le mélange réactionnel est abandonné alors pendant 10 à 30 minutes à 0°C. Après un contrôle par chromatographie sur couche mince, le milieu réactionnel est alcalinisé à pH 8,5 à -10°C, par une solution saturée de bicarbonate de sodium.

30 La solution alcaline est extraite à 0°C avec son propre volume en chlorure de méthylène refroidi à 0°C jusqu'à obtention d'une réaction de Meyer négative sur la phase aqueuse. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et filtrées à 0°C.

35 On y ajoute alors  $1.43 \cdot 10^{-3}$  M (1,1 équivalent) de l'ester aminé retenu et on concentre sous vide jusqu'à un volume de 4 ml environ. Cette solution est alors conservée pendant 24 à 48 h à 4°C. L'évolution de la réaction est suivie par la chromatographie sur couche mince.

La solution est alors tirée à sec et fournit 1,05 g de produit de couplage brut qui est quasi unitache à la chromatographie sur couche mince.

Purification.

5 Le résidu sec obtenu ci-dessus est placé sur une colonne de gel de silice et élué avec un mélange éther-méthanol saturé en ammoniac 96% + 4%.

On recueille des fractions de 10 ml et on les teste en chromatographie sur couche mince. La révélation se fera à la ninhydrine (acides aminés) et au cérique (alcaloïdes).

10 Lorsque les acides aminés sont passés (ninthydrine -), on élue encore avec 100 cm<sup>3</sup> du solvant employé avant de le changer par un mélange 92% - 8%.

15 L'alcaloïde couplé à l'acide aminé est alors récolté (cérique +).

Les fractions identiques sont rassemblées, concentrées à sec au Rotavapor, reprises au chlorure de méthylène, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées à sec. La mousse obtenue est l'alcaloïde dimère couplé avec l'acide aminé tout pur dont les données physico-chimiques seront faites sur une partie aliquote. Le restant sera directement transformé en sulfate. Les rendements en base des différents dérivés sont donnés à titre indicatif et susceptibles d'amélioration.

Préparation du sulfate.

25 La base amorphe (mousse) obtenue ci-dessus est reprise dans 20 fois son poids en éthanol.

A cette solution, on ajoute alors, très lentement et sous vive agitation, 2 équivalents d'acide sulfurique provenant d'une solution 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/98% éthanol anhydre. (0,484 équivalent/litre). Après l'addition des 2 équivalents, on laisse encore agiter pendant une demi-heure avant de concentrer sous pression réduite. Par addition d'éther sulfurique anhydre, sous vive agitation, le sulfate du dérivé engagé précipite. Filtration et séchage sous vide à 10°C fournissent le sulfate du dérivé couplé prêt à l'emploi.

35 La numérotation adoptée pour la description des spectres de résonance magnétique nucléaire des exemples qui suivent est inspirée de celle proposée par Le Men et Taylor pour les dérivés du type aspidospermidine (Experientia 21, 508, 1965).

Exemple 1 :Préparation de la vinblastine (VLB) base

A une solution de 1,5 g de sulfate de VLB ( $1.65 \cdot 10^{-3}$  M) dissous dans 15 cc d'eau distillée, sont ajoutés successivement 5 sous vive agitation, 15 cc de chlorure de méthylène ainsi que 1,5 cc d'ammoniaque concentrée. Après cinq minutes, le mélange est décanté et la phase aqueuse extraite avec encore 3 x 15 cc de chlorure de méthylène. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec 2 x 40 cc d'eau désionisée, séchées sur sulfate de sodium anhydre puis évaporées à sec au rotavapor. On recueille 10 ainsi 1,32 g de VLB base (99 %).

Préparation de la descarbométhoxy-3-désacétyl-0-4 vinblastine carboxhydrazide-3 (VLH)

A une solution de 1 g de VLB base ( $1.23 \cdot 10^{-3}$  M) dans 15 7 ml d'éthanol anhydre, on ajoute 14 ml d'hydrazine anhydre et 7 ml d'éthanol anhydre. Le mélange réactionnel ainsi formé est maintenu vingt heures à 60°C.

Après refroidissement, on ajoute 28 ml d'eau saturée en sel et on extrait avec un même volume de chlorure de méthylène 20 jusqu'à obtention d'une réaction de Meyer négative sur la phase aqueuse acidifiée.

Les phases organiques sont séchées sur  $MgSO_4$  et évaporées à sec sous pression réduite.

L'hydrazide obtenu avec 88 % de rendement (0,760 g) 25 est unitache en chromatographie sur couche mince.

Exemple 2 :Synthèse de la N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate d'éthyle (VLE)

A une solution de 275 mg ( $3,58 \cdot 10^{-4}$  M) de 0-4 désacétyl 30 vinblastine hydrazide dans 7 ml de méthanol anhydre et 20,5 ml d'HCl 1N, refroidie préalablement à 0°C, on ajoute 58 mg de nitrite de sodium.

On laisse agiter pendant 25 minutes avant de revenir 35 à un pH de 8,5 par addition d'une solution de bicarbonate de sodium à 5 %. L'azoture formé est extrait au chlorure de méthylène.

La phase organique est séchée sur  $MgSO_4$  et filtrée. On y ajoute alors 68,4 mg de leucinate d'éthyle ( $4,29 \cdot 10^{-4} M$ ) et on concentre sous vide, jusqu'à l'obtention de 4 ml environ.

Cette solution est alors laissée pendant 24 heures  
5 au réfrigérateur.

La réaction étant alors terminée, on ajoute 50 ml de chlorure de méthylène et on lave plusieurs fois avec le même volume d'eau déminéralisée puis une fois avec une solution saturée en NaCl.

10 Les phases organiques sont séchées sur  $MgSO_4$ , filtrées puis évaporées sous vide.

On recueille ainsi 300 mg de produit brut auxquels on ajoute 0,035 g de  $H_2SO_4$  en solution dans 1 ml de méthanol anhydre.

Le sel formé est précipité à l'éther.

15 Le précipité est lavé dix fois avec 50 cc d'éther diéthylique anhydre.

Le résidu, 183 mg (57 %) ne contient que du sulfate de VLE pratiquement pur et exempt de leucinate d'éthyle.

Après libération des bases, ces dernières peuvent être chromatographiées sur gel de silice (10 g de  $SiO_2$ ) et éluées avec 20 50 cc d'éther/MeOH-NH<sub>3</sub> sat. (92 %/8 %) puis 250 ml d'éther/MeOH-NH<sub>3</sub> (85 %/15 %). La VLE est obtenue pure en tête du second éluat. On recueille ainsi 49 % de VLE purifiée soit 152 mg de base.

#### Propriétés physico-chimiques de la VLE

25 Point de fusion : ~ 169°C

$[\alpha]D_{CHCl_3}$  : 60°  
c = 0,35

Spectre ultraviolet (MeOH,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

221 (4,62) ; 267 (4,15) ; 287 (4,02) ; 295 (3,99).

Spectre infra-rouge (KBr,  $cm^{-1}$ ) :

30 3470, 2960, 2880, 1735, 1665, 1610.

Spectre de masse (m/e, %) :

924 (6)  $M^+ +28$  ; 910 (56)  $M^+ +14$  ; 897 (62) ; 896 (100) ; 865 (25) ;  
938 (68) ; 772 (19) ; 709 (25) ; 651 (43) ; 571 (69).

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $H^1$ ,  $CDCl_3$ , ppm, 360MHz) :

9,66 (1H, bs,  $C^{16}-OH$ ) ; 8,20 (1H, s,  $N^{\alpha}H$ ) ; 7,52 (1H, d) ;  
 7,15 (3H, m) ; 6,56 (1H, s,  $C^9-H$ ) ; 6,05 (1H, s,  $C^{12}-H$ ) ;  
 5,86 (1H, dd,  $C^{14}-H$ ,  $J_{14-15} = 12$  ;  $J_{14-3} = 3,6$  ; 5,78 (1H, d,  $C^{15}-H$ ) ;  
 4,69 (1H, m,  $CH(NHR)CO-$ ) ; 4,2 (2H, q,  $OCH_2 CH_3$ ) ; 4,18 (1H, t,  $C^{17}-H$ ) ;  
 3,77 (3H, s,  $OCH_3$ ) ; 3,66 (3H, s,  $OCH_3$ ) ; 3,47 (1H, s,  $C_5-H$ ) ;  
 2,77 (3H, s,  $N^{\alpha}-CH_3$ ) ; 0,92 (12H, m,  $-C^{18}H_3 + C^{18'}H_3 + isopropyl$ ).

Exemple 3 :

$N$ -désacétyl- $O$ -4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate de méthyle (VLM)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21

on obtient la VLM avec un rendement de 68 %.

Propriétés physico-chimiques de la VLM

Point de fusion :  $\sim 172^\circ C$

$[\alpha]_D^{CHCl_3} : 67^\circ$   
 $c = 0,27$

Spectre ultraviolet ( $CH_3OH$ ,  $\lambda$  max, nm, log  $\epsilon$ ) :

220 (4,61) ; 267 (4,15) ; 287 (4,03) ; 294 (3,98).

Spectre infra-rouge (KBr,  $cm^{-1}$ ) :

3475 ; 2960 ; 2880 ; 1740 ; 1680 ; 1615.

Spectre de masse (m/e, %) :

910 (25)  $M^{+}+28$  ; 896 (78)  $M^{+}+14$  ; 883(26)  $M^{+}+1$  ; 882(36)  $M^{+}$  ;  
 850 (29) ; 836 (41) ; 822 (100) ; 708 (15) ; 681 (56) ; 650 (78) ;  
 570 (70).

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $CDCl_3$ , ppm, 60 MHz) :

9,21 (1H, s,  $C^{16}-OH$ ) ; 8,1 (1H, s,  $N^{\alpha}-H$ ) ; 7,53 (1H, m) ; 7,23 (3H, m) ;  
 6,63 (1H, s,  $C^9-H$ ) ; 6,13 (1H, s,  $C^{12}-H$ ) ; 5,86 (2H, m,  $C^{14}-H + C^{15}-H$ ) ;  
 3,83 (3H, s,  $-OCH_3$ ) ; 3,80 (3H, s,  $-COOCH_3$ ) ; 3,63 (3H, s,  $-OCH_3$ ) ;  
 2,8 (3H, s,  $-N^{\alpha}-CH_3$ ) ; 0,96 (12H, m,  $C^{18}H_3 + C^{18'}H_3 + isopropyl$ ).

Exemple 4 :

$N$ -(désacétyl- $O$ -4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate de n-butyle (VLn-But)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21

on obtient la VLn-But avec un rendement de 58 %.

Propriétés physico-chimiques de la VLn-But

Point de fusion :  $\sim 158^\circ C$

$\text{CHCl}_3$   
 $[\alpha]_D = 0,26$  :  $74^\circ$

Spectre ultraviolet ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

220 (4,66) ; 266 (4,21) ; 289 (4,08) ; 296 (4,03).

Spectre infra-rouge (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) :

5 3470, 2960, 2880, 1740, 1670, 1615.

Spectre de masse (m/e, %) :

952(5)  $\text{M}^+ + 28$  ; 938(31)  $\text{M}^+ + 14$  ; 924(12)  $\text{M}^+$  ; 923(15)  $\text{M}^+ - 1$  ;  
 891(13) ; 863(36) ; 835(5) ; 821(11) ; 708(33) ; 650(81) ;  
 570(100).

10 Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , ppm, 60MHz) :

9,6 (1H,s, $\text{C}^{16}$ -OH) ; 8,06 (1H,s,N'-H) ; 7,5 (1H,m) ; 7,2 (3H,m) ;  
 6,63 (1H,s, $\text{C}^9$ -H) ; 6,1 (1H,s, $\text{C}^{12}$ -H) ; 5,86 (2H,m, $\text{C}^{14}$ -H +  $\text{C}^{15}$ -H) ;  
 4,2 (2H,t,-COO- $\text{CH}_2$ ) ; 3,83 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ; 3,63 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ;  
 2,8 (3H,s,-N-CH<sub>3</sub>) ; 1 (15H,m,-C<sup>18</sup>H<sub>3</sub> + C<sup>18</sup>H<sub>3</sub>) ; CH<sub>3</sub> du butyle ;

15 CH<sub>3</sub> isopropyl).

Exemple 5 :

N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate d'octyle (VL-octyl)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21  
 on obtient la VL-octyl avec un rendement de 48 %.

20 Propriétés physico-chimiques de la VL-Octyl

Point de fusion : ~ 145°C

$\text{CHCl}_3$   
 $[\alpha]_D = 0,33$  : 54°

Spectre ultraviolet ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

8,62 mg/1

25 217 (4,69) ; 265 (4,14) ; 289 (4,01) ; 295 (3,95).

Spectre infra-rouge (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) :

3460 ; 2940 ; 2920 ; 2870 ; 1735 ; 1665 ; 1610 ; 1500 ; 1455.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , ppm, 60MHz) :

9,6 (1H,s, $\text{C}^{16}$ -OH) ; 8,1 (1H,s,N'-H) ; 7,55 (1H,m) ; 7,23 (3H,m) ;  
 6,5 (1H,s, $\text{C}^9$ -H) ; 6,12 (1H,s, $\text{C}^{12}$ -H) ; 5,90 (2H,m, $\text{C}^{14}$ -H +  $\text{C}^{15}$ -H) ;  
 4,2 (2H,t,-O- $\text{CH}_2$ -Oct ; 1H,d, $\text{C}^{17}$ -H) ; 3,83 (3H,s,-COOCH<sub>3</sub>) ;  
 3,67 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ; 3,56 (1H,s, $\text{C}^5$ -H) ; 2,83 (3H,s,N-CH<sub>3</sub>) ;

1,33 (1OH,m, massif octyl +  $\text{CH}_2^{19'}$  +  $\text{CH}_2^{19'}$ ) ; 1 (15H,m, massif octyl +  $\text{CH}_3^{18'}$  +  $\text{CH}_3^{18'}$ ).

Exemple 6 :

N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-D-leucinate d'éthyle (VDLE)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
on obtient la VDLE avec un rendement de 74 %.

Propriétés physico-chimiques de la VDLE :

Point de fusion : ~ 181°C

10  $\text{CHCl}_3$   
 $[\alpha]_D$  c = 0,28 : 70°

Spectre ultraviolet (méthanol,  $\lambda_{\text{max}}$ , nm,  $\log \epsilon$ ) :

220 (4,67) ; 226 (4,20) ; 288 (4,11) ; 295 (4,02).

Spectre infrarouge (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) :

3460 ; 2960 ; 2880 ; 1735 ; 1665 ; 1605.

15 Spectre de masse (m/e %) :

924(14)  $\text{M}^+ + 28$  ; 910 (32) ;  $\text{M}^+ + 14$  ; 897(38)  $\text{M}^+ + 1$  ; 896(66)  $\text{M}^+$  ;

863(28) ; 835(43) ; 709(43) ; 651(81) ; 570(100).

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , ppm, 60MHz) :

9,6 (1H,s,  $\text{C}^{16'}-\text{OH}$ ) ; 8,16 (1H,s,  $\text{N}^\alpha-\text{H}$ ) ; 7,66 (1H,m) ; 7,26 (3H,m) ;

20 6,7 (1H,s,  $\text{C}^9-\text{H}$ ) ; 6,16 (1H,s,  $\text{C}^{12}-\text{H}$ ) ; 5,90 (2H,m,  $\text{C}^{14}-\text{H} + \text{C}^{15}-\text{H}$ ) ;  
4,26 (2H,q, - $\text{COOCH}_2$ ) ; 3,83 (3H,s, - $\text{OCH}_3$ ) ; 3,66 (3H,s, - $\text{OCH}_3$ ) ;  
2,90 (3H,s, - $\text{N}^\alpha-\text{CH}_3$ ) ; 1,3 (3H,t, -( $\text{COOCH}_2-\text{CH}_3$ ) ; 0,96 (12H,m,  $\text{C}^{18'}-\text{H}_3 +$   
 $\text{C}^{18}\text{H}_3$  + isopropyl).

Exemple 7 :

N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-sérintate d'éthyle (VSE)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
on obtient la VSE avec un rendement de 35 %.

Propriétés physico-chimiques de la VSE :

30  $\text{CHCl}_3$   
 $[\alpha]_D$  c = 0,7 : 65°

Spectre ultraviolet (MeOH,  $\lambda_{\text{max}}$ , nm,  $\log \epsilon$ ) :

215 (4,76) ; 266 (4,31) ; 288 (4,20) ; 297 (4,15).

Spectre infrarouge ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) :

3460 ; 3400 ; 2965 ; 2935 ; 2880 ; 1730 ; 1665 ; 1605.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , ppm, 60MHz) :  
 8,13 (1H,s,N<sup>a'</sup>-H) ; 7,9 (1H,d,-OH) ; 7,52 (1H,m) ; 7,20 (3H,m) ;  
 6,63 (1H,s,C<sup>9</sup>-H) ; 6,1 (1H,s,C<sup>12</sup>-H) ; 5,9 (2H,m,C<sup>14</sup>-H + C<sup>15</sup>-H) ;  
 4,3 (2H,q,-COO-CH<sub>2</sub>-) ; 3,83 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ; 3,66 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ;  
 2,67 (3H,s,-N<sup>a'</sup>CH<sub>3</sub>) ; 1,34 (3H,t,(-COO-CH<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>) ;  
 5 0,95 (6H,m,C<sup>18</sup>'H<sub>3</sub> + C<sup>18</sup>H<sub>3</sub>).

Exemple 8 :N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-glutamate d'éthyle (VGE)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
 on obtient la VGE avec un rendement de 55 %.

Propriétés physico-chimiques de la VGE :Point de fusion : 149°C
$$\frac{\alpha}{D} \text{CHCl}_3 : 59^\circ$$

$$c = 2$$
Spectre ultraviolet (MeOH, 10mg/l,  $\lambda_{\text{max}}$ , nm, log ε) :

15 219 (4,46) ; 269 (3,94) ; 288 (3,80) ; 296 (3,76).

Spectre infra-rouge (KBr, cm<sup>-1</sup>) :

3460 ; 3395 ; 2960 ; 2920 ; 2870 ; 1730 ; 1665 ; 1610 ; 1500.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , ppm, 60MHz) :

9,63 (1H,s,C<sup>16</sup>-OH) ; 8,10 (1H,s,N<sup>a'</sup>-H) ; 7,6 (1H,m) ; 7,16 (3H,m) ;  
 20 6,64 (1H,s,C<sup>9</sup>-H) ; 6,07 (1H,s,C<sup>12</sup>-H) ; 5,83 (2H,m,C<sup>14</sup>H + C<sup>15</sup>H) ;  
 4,23 (2H,q,-COOCH<sub>2</sub>-) ; 4,16 (2H,q,-COOCH<sub>2</sub>-) ; 3,8 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ;  
 3,64 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ; 3,5 (1H,s,C<sup>5</sup>-H) ; 2,8 (3H,s,-N<sup>a'</sup>CH<sub>3</sub>) ;  
 1,33 (3H,t,-CH<sub>3</sub>) ; 1,26 (3H,t,-CH<sub>3</sub>) ; 1 (6H,m,C<sup>18</sup>'H<sub>3</sub> + C<sup>18</sup>H<sub>3</sub>).

Exemple 9 :N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-phényl-alaninate d'éthyle (VPE)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
 on obtient la VPE avec un rendement de 66 %.

Propriétés physico-chimiques de la VPE :Point de fusion : 154°C
$$\frac{\alpha}{D} \text{CHCl}_3 : 78^\circ$$

$$c = 1,2$$
Spectre ultraviolet (MeOH, 9,8 mg/l,  $\lambda_{\text{max}}$ , nm, log ε) :

217,5 (4,67) ; 265 (4,13) ; 286,5 (3,99) ; 295,5 (3,95).

Spectre infra-rouge (KBr, cm<sup>-1</sup>) :

3560 ; 3460 ; 3400 ; 2860 ; 2830 ; 1730 ; 1650 ; 1610 ; 1500 ; 1455.

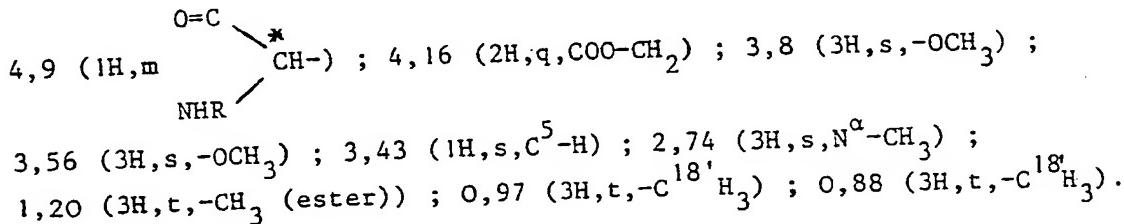
Spectre de masse (m/e, %) :

958(17) ; 944(41) ; 930(35) ; 871(64) ; 651(41) ; 588(41) ;

5 571(53) ; 401(100).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (CDCl<sub>3</sub>, ppm, 360MHz) :

9,48 (1H,bs,-C<sup>16</sup>-OH) ; 8,1 (1H,s,N<sup>a</sup>-H) ; 7,6 (1H,d) ; 7,5 (1H,d) ;  
7,3 à 7,02 (7H,m) ; 6,6 (1H,s,C<sup>9</sup>-H) ; 6,1 (1H,s,C<sup>12</sup>-H) ;  
5,87 (2H,m,C<sup>14</sup>-H + C<sup>15</sup>-H) (J<sup>15-14</sup>=12Hz ; J<sup>14-3</sup>=8,6Hz) ;

10   
4,9 (1H,m) ; 4,16 (2H,q,COO-CH<sub>2</sub>) ; 3,8 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ;  
3,56 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ; 3,43 (1H,s,C<sup>5</sup>-H) ; 2,74 (3H,s,N<sup>a</sup>-CH<sub>3</sub>) ;  
1,20 (3H,t,-CH<sub>3</sub> (ester)) ; 0,97 (3H,t,-C<sup>18</sup>H<sub>3</sub>) ; 0,88 (3H,t,-C<sup>18</sup>H<sub>3</sub>).

Exemple 10 :N-désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-isoleucinate de méthyle (VILM)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
on obtient la VILM avec un rendement de 66 %.

Propriétés physico-chimiques de la VILM

20 CHCl<sub>3</sub>

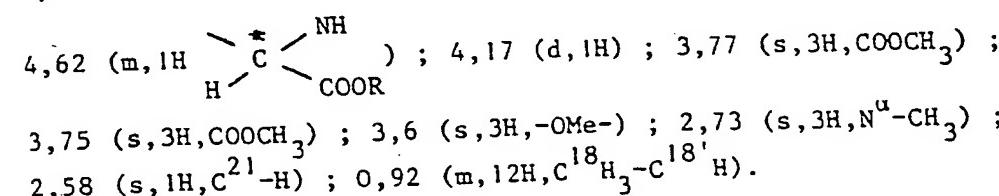
$[\alpha]_D$  : ~ 66°  
C = 0,135

Spectre ultraviolet (MeOH,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

225 (4,55) ; 266 (4,18) ; 288 (4,05) ; 295 (4,00).

Spectre de résonance magnétique nucléaire (CDCl<sub>3</sub>, 360MHz) :

9,48 (bs,1H,C<sup>16</sup>-OH) ; 8,03 (s,1H,NH) ; 7,51 (m,2H) ;  
7,23-7,06 (m,2H) ; 6,58 (s,1H,C<sup>9</sup>-H) ; 6,20 (s,1H,C<sup>12</sup>-H) ;  
5,85 (dd,1H,C<sup>14</sup>-H ; J<sup>15-14</sup>=12Hz ; J<sup>14-3</sup>=3,6Hz) ; 5,78 (d,1H,C<sup>15</sup>-H) ;

30   
4,62 (m,1H) ; 4,17 (d,1H) ; 3,77 (s,3H,COOCH<sub>3</sub>) ;  
3,75 (s,3H,COOCH<sub>3</sub>) ; 3,6 (s,3H,-OMe-) ; 2,73 (s,3H,N<sup>a</sup>-CH<sub>3</sub>) ;  
2,58 (s,1H,C<sup>21</sup>-H) ; 0,92 (m,12H,C<sup>18</sup>H<sub>3</sub>-C<sup>18</sup>H<sub>3</sub>).

Exemple 11 :N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tyrosinate d'éthyle (V-Tyr E)

En appliquant le mode opératoire général de la page 23,  
on obtient la V-Tyr E avec un rendement de 48 %.

5   Propriétés physico-chimiques de la V-Tyr E

$[\alpha]_D^{CHCl_3}$  : 64°  
c = 0,1087

Spectre ultra-violet (CH<sub>3</sub>OH,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

227 (4,73) ; 266 (4,26) ; 288 (4,07) ; 296 (3,94).

10   Spectre infra-rouge (KBr, cm<sup>-1</sup>) :

3460, 3400, 3040, 2950, 2840, 1715, 1660, 1610, 1500, 1455, 1225.

Spectre de résonance magnétique nucléaire (360 MHz) :

9,6 (bs, 1H, C<sup>16</sup>-OH) ; 8,05 (s, 1H, NH) ; 7,55 (m, 2H) ; 7,21-7,06 (m, 2H) ;  
7,03 (d, 2H, arom tyr J=7,5) ; 6,7 (d, 2H, arom tyr. J=7,5) ;  
15 6,55 (s, 1H, C<sup>9</sup>-H) ; 6,05 (s, 1H, C<sup>12</sup>-H) ; 5,83 (dd, 1H, C<sup>14</sup>-H ;  
J<sup>15-14</sup>=12Hz ; J<sup>14-3</sup>=3,6 Hz) ; 5,76 (d, 1H, C<sup>15</sup>-H) ; 4,83 (m, 1H, CH) ;  
4,13 (massif 3H, -COOCH<sub>2</sub>, C<sup>17</sup>-H) ; 3,76 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>-) ;  
3,6 (s, 3H, -COOCH<sub>3</sub>) ; 3,45 (s, 1H, C<sup>5</sup>-H) ; 2,71 (s, 3H, -N<sup>a</sup>-CH<sub>3</sub>) ;  
1,21 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>OOC)) ; 0,88 (m, 6H, -C<sup>18</sup>H<sub>3</sub>-C<sup>18'</sup>H<sub>3</sub>).

20   Exemple 12 :N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle  
(V-Trypt E)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
on obtient la V-Trypt E avec un rendement de 72 %.

25   Propriétés physico-chimiques de la V-Trypt E

$[\alpha]_D^{CHCl_3}$   
c = 0,51 : ~ 90°

Spectre ultra-violet (MeOH,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

225 (5,15) ; 267 (4,65) ; 280 (ep) ; 290 (4,55).

30   Spectre de masse (m/e) :

970, 391, 279, 165, 108, 35 ; ionisation moléculaire à l'isobutane  
998 M<sup>+</sup>+29, 984 M<sup>+</sup>+15, 970 M<sup>+</sup>+1, 926

Spectre infra-rouge (KBr, cm<sup>-1</sup>) :

3460, 3400, 3040, 2960, 2940, 2880, 1725, 1660, 1610, 1500, 1455,  
35 1225, 740

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , 360MHz) :

9,5 (1H,s,C<sup>16</sup>-OH) ; 8,2 (1H,s,NH,trypt) ; 8,03 (1H,s,NH) ;  
 7,66 (1H,d,trypt ; J=7,2Hz) ; 7,58 (1H,d,trypt ; J=7,2Hz) ;  
 7,51 (1H,d,trypt ; J=7, 2Hz) ; 7,31 (1H,d,trypt; J=7,2Hz) ;  
 5 7,25-7,04 (5H,m) ; 6,58 (1H,s,C<sup>9</sup>-H) ; 6,06 (1H,s,C<sup>12</sup>-H) ;  
 5,83 (1H,dd,C<sup>14</sup>-H ; J=12Hz ; J=3,6Hz) ; 5,78 (1H,d,C<sup>15</sup>-H ; J=12Hz) ;  
 4,95 (1H,q, > CH) ; 3,75 (3H,s,-COOCH<sub>3</sub>) ; 3,6 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ;  
 3,4 (1H,s,C<sup>5</sup>-H) ; 2,77 (1H,s,N-CH<sub>3</sub>) ; 1,15 (3H,t,-COOCH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>))

Exemple 13 :

10 N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate de méthyle  
(V-Trypt M)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
on obtient le V-Trypt M avec un rendement de 41 %.

Propriétés physico-chimiques de la V-Trypt M :

15  $\text{CHCl}_3$   
 $[\alpha]_D$  : ~ 94°  
 $c=1,82$

Spectre ultra-violet (MeOH,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

269 (4,48) ; 280 ; 289 (4,32).

Spectre infra-rouge (KBr, cm<sup>-1</sup>) :

20 1730, 1710, 1660, 1610, 1495, 1455, 1220, 740.

Spectre de résonance magnétique nucléaire (360 MHz) :

9,5 (1H,bs,C<sup>16</sup>-OH) ; 8,06 (1H,s,NH ind) ; 8,01 (1H,s,NH ind) ;  
 7,65 (1H,d) ; 7,58 (1H,d) ; 7,38-7,06 (7H,m) ; 6,41 (1H,s,C<sup>9</sup>-H) ;  
 6,05 (1H,s,C<sup>12</sup>-H) ; 5,85 (1H,dd,C<sup>14</sup>-H ; J=12Hz ; J'=3,6Hz) ;  
 25 5,78 (1H,d,C<sup>15</sup>-H ; J=12Hz) ; 4,95 (1H,q,C) ; 4,2 (1H,m,C<sup>17</sup>-H) ;  
 3,75 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ; 3,61 (3H,s,-COOCH<sub>3</sub>) ; 3,58 (3H,s,-COOCH<sub>3</sub>) ;  
 3,43 (2H,s,C<sup>5</sup>-H) ; 2,6 (3H,s,N-CH<sub>3</sub>).

Exemple 14 :

N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-valinate d'éthyle (VVE)

30 En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
on obtient la VVE avec un rendement de 63 %.

Propriétés physico-chimiques de la VVESpectre ultra-violet (MeOH,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

226 (4,95) ; 267 (4,57) ; 285 (4,45) ; 296 (4,40).

Spectre de masse (m/e %) :

910 (0,1) ; 896 (2) ; 882 (5) ; 823 (4,5) ; 822 (6) ; 708 (5,3) ;  
 653 (9,2) ; 651 (8,7) ; 650 (14,6) ; 572 (8,7) ; 571 (23,3) ;  
 539 (10,7) ; 355 (16) ; 354 (10) ; 353 (31) ; 294 (17) ; 188 (8,5) ;  
 5 156 (100) ; 155 (11,8) ; 154 (11,3) ; 144 (12,2) ; 141 (12,1) ;  
 140 (16,4) ; 136 (13) ; 135 (20,4) ; 124 (61) ; 122 (35,5) ;  
 121 (15,3).

Spectre infra-rouge (KBr, cm<sup>-1</sup>) :

3540, 3470, 3420, 2960, 2930, 2870, 1730, 1720, 1670, 1610, 1500,  
 10 1455, 1225, 745.

Spectre de résonance magnétique nucléaire :

9,48 (1H,bs,C<sup>16</sup>-OH) ; 8,03 (1H,bs,NH ind) ; 7,55 (1H,d ; J=7,2Hz) ;  
 7,51 (1H,d,J=7,2Hz) ; 7,51 (1H,d) ; 7,23 à 7,06 (3H,m) ;  
 6,58 (1H,s,C<sup>9</sup>-H) ; 6,06 (1H,s,C<sup>12</sup>-H) ; 5,85 (1H,dd,C<sup>14</sup>-H ;  
 15 J<sup>14-15</sup>=12Hz ; J<sup>14-3</sup>=3,6Hz) ; 5,78 (1H,d,C<sup>15</sup>-H ; J=12Hz) ;  
 4,56 (1H,dd,C) ; 4,21 (2H,q,COOCH<sub>2</sub>) ; 4,15 (1H,d,C<sup>17</sup>-H) ;  
 3,96 (1H,t) ; 3,76 (3H,s,OCH<sub>3</sub>) ; 3,6 (3H,s,COOCH<sub>3</sub>) ; 3,46 (1H,s,C<sup>5</sup>-H) ;  
 2,73 (3H,s,N-CH<sub>3</sub>) ; 1,31 (6H,m,COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ; 0,96 (14H,m) ;  
 0,9 (14H,t).

Exemple 15 :N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-iso-leucinate d'éthyle (VILE)

En appliquant le mode opératoire général de la page 21.  
 on obtient la VILE avec un rendement de 58 %.

Propriétés physico-chimiques de la VILESpectre ultra-violet (MeOH, λ max, nm, log ε) :

226 (4,94) ; 266 (4,56) ; 285 (4,44) ; 295 (4,38).

Spectre de masse (m/e %) :

924 (7) ; 910 (11) ; 897 (23) ; 896 (44,4) ; 867 (11,3) ; 837 (18,7) ;  
 836 (26,6) ; 822 (4) ; 709 (10) ; 650 (21) ; 571 (13) ; 570 (34,7) ;

30 366 (21,7) ; 154 (100) ; 126 (11).

Spectre infra-rouge (KBr, cm<sup>-1</sup>) :

3460, 3440, 3040, 2960, 2940, 2880, 1730, 1665, 1610, 1500, 1455,  
 1225, 745.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , 360MHz) :

9,46 (1H,bs,C<sup>16</sup>-OH) ; 8,03 (1H,bs,NH) ; 7,55 (1H,d ; J = 7,2Hz) ;  
 7,51 (1H,d) ; 7,23 à 7,06 (3H,m) ; 6,58 (1H,s,C<sup>9</sup>-H) ;  
 6,06 (1H,s,C<sup>12</sup>-H) ; 5,85 (1H,dd,C<sup>14</sup>-H ; J=12Hz ; J'=3,6Hz) ;  
 5 5,78 (1H,d,C<sup>15</sup>-H ; J=12Hz) ; 4,61 (1H,q,(dd), C) ; 4,21 (2H,q,  
 $\text{COO}-\text{CH}_2-$ ) ; 4,15 (1H,d,C<sup>17</sup>-H) ; 3,96 (1H,t) ; 3,76 (3H,s,OCH<sub>3</sub> ester) ;  
 3,6 (3H,s,OCH<sub>3</sub>) ; 3,46 (1H,s,C<sup>5</sup>-H) ; 2,73 (3H,s,N-CH<sub>3</sub>) ;  
 1,25 (3H,t,COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

Exemple 16 :

10 N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-D-tryptophanate d'éthyle  
(VD Trypt E)

A En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
 on obtient la VD Trypt E avec un rendement de 69 %.

Propriétés physico-chimiques de la VD Trypt E

15  $[\alpha]_D^{25}$   
 $c=0,3295 : \sim 70^\circ$

Spectre ultra-violet (MeOH,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

225 (4,77) ; 269 (4,30) ; 290 (4,20) ; 320 (ep).

Spectre de masse (m/e %) :

20 970, 391, 279, 165, 108, 35.

Spectre infra-rouge (KBr, cm<sup>-1</sup>) :

3460, 3400, 3050, 2960, 2940, 2870, 1735, 1665, 1610, 1495, 1455,  
 1210, 740.

Spectre de résonance magnétique nucléaire :

25 9,53 (1H,bs,C<sup>16</sup>-OH) ; 8,1 (1H,s,NH ind tryp) ; 8,02 (1H,s,NH ind) ;  
 7,76 (1H,d) ; 7,65 (1H,d) ; 7,51 (1H,d) ; 7,35 (1H,d) ; 7,2 à  
 7,05 (6H,m) ; 6,53 (1H,s,C<sup>9</sup>H) ; 5,98 (1H,dd,C<sup>14</sup>H J<sup>14-15</sup>=12Hz,  
 $J'14-3=3,6$  Hz) ; 5,73 (1H,d,C<sup>15</sup>-H ; J=12Hz) ; 4,86 (1H,q,C-) ;  
 4,1 (3H,m,C<sup>17</sup>-H-COOCH<sub>2</sub>) ; 3,75 (3H,s,COOCH<sub>3</sub>) ; 3,6 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ;  
 30 3,33 (2H,s,C<sup>5</sup>-H) ; 2,43 (3H,s,N-CH<sub>3</sub>) ; 1,16 (3H,t,-COOCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ;  
 0,93 (8H,m).

Exemple 17 :

N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-valinyl-L-tryptophanate  
d'éthyle (V-Val-Trypt-E)

A 35 En appliquant le mode opératoire général de la page 21,  
 on obtient la V-Val-Trypt E avec un rendement de 40 %.

Propriétés physico-chimiques de la V-Val-Trypt-E

$(\alpha)_D^{CHCl_3}$  : 36°  
 $c=0,3589$

Spectre ultra-violet (méthanol,  $\lambda$  max, nm, log ε) :

5 270 (4,42) ; 290 ; 312 (4,96).

Spectre infra-rouge (KBr,  $cm^{-1}$ ) :

3480, 3400, 2960, 2940, 2870, 1735, 1725, 1660, 1610, 1500, 1455,  
 1230.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $CDCl_3$ , 360MHz) :

10 9,5 (1H,bs,C<sup>16</sup>-OH) ; 8,18 (1H,s,NH ind) ; 8,01 (1H,s,NH ind) ;  
 7,6 à 7,06 (1OH,m arom) ; 6,41 (1H,s,C<sup>9</sup>-H) ; 5,95 (1H,s,C<sup>12</sup>-H) ;  
 5,85 (1H,dd,C<sup>14</sup>-H) ;  $J^{15-14}=12Hz$  ;  $J^{8-14}=3,6Hz$  5,75 (1H,d,C<sup>15</sup>-H) ;  
 $J^{15-14}=12Hz$  ; 5,02 (1H,m,C) ; 4,9 (1H,m,C) ; 3,73 (3H,s,COOCH<sub>3</sub>) ;  
 3,56 (3H,s,-OCH<sub>3</sub>) ; 3,43 (2H,s,C<sup>5</sup>-H) ; 2,61 (3H,s,N-CH<sub>3</sub>) ;  
 1,18 (3H,t,-COOCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ; 1,05-0,86 ( $\pm$  1H,m,CH<sub>3</sub>).

Exemple 18 :N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-leucyl-L-alanyl-L-leucyl-L-alaninate d'éthyle (V-Leu-Ala-Leu-Ala-E)

En appliquant le mode opératoire général et en préparant  
 20 l'azoture à partir de 700 mg de monohydrazide, le couplage avec  
 377 mg de L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Alaninate d'éthyle à 4°C pendant  
 60 heures fournit 213 mg de V-Leu-Ala-Leu-Ala-E pure. La  
 purification est effectuée par passage du produit brut d'abord sur  
 une colonne de silice 60 Merck (230 mesh) en utilisant comme éluant  
 25 un mélange éther-MeOH sat NH<sub>3</sub> (86:14), puis sur une colonne  
 identique en utilisant comme éluant un mélange isopropanol-acétate  
 d'éthyle-cyclohexane (40:20:40).

Propriétés physico-chimiques de la V-Leu-Ala-Leu-Ala-E

Spectre UV (méthanol, 5,74 mg/100cc, log ε) : 266 (4,24) ;  
 30 285-288 (4,12) ; 296 (4,07)

Spectre de masse (DCI à l'isobutane, ionisation moléculaire)  
 1152 (M<sup>+</sup> +1), 1166 (M<sup>+</sup> +1+14), 1134, 1108, 1094

Spectre IR (KBr) : 3400, 2960, 1740, 1660, 1620, 1506, 1460, 1225,  
 $745 cm^{-1}$ .

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $CDCl_3$ , 360 MHz, ppm)

0,91, 1,27 (t), 1,40 (2d), 1,67 (dxd), 2.61 (s), 2.72 (s), 3.60 (s),  
 3,75 (s), 4.19 (q), 5.74 (d), 5.83 (dxd), 6.03 (s), 6.59 (s),

6.88 (d), 7.00 (d), 7.39 (d), 7.49 (d), 7.53 (d), 8.02 (s),  
9.57 (s).

Exemple 19 :

N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophyl-L-tryptophanate d'éthyle (V-Tryp-Tryp-E).

En appliquant le mode opératoire général et en utilisant 1 g d'hydrazide et 543 mg de L-tryptophyl-L-tryptophanate d'éthyle, on isole 268 mg de V-Tryp-Tryp-E pure. La purification est effectuée par passage sur une colonne de silice en utilisant comme éluant d'abord un mélange éther-méthanol saturé en NH<sub>3</sub> (92:8) puis un mélange identique en proportion 86:14.

Propriétés physico-chimiques

Spectre UV (MeOH) : max 272 (4,38), 278 (4,37), 2,90 (4,31)  
(49,6 mg/1) min 248 (4,18), 288 (4,30)

15 Spectre de masse : ionisation moléculaire à l'isobutane  
1184, 1170, 1156(M<sup>+</sup> +1), 1112, 1098, 624,  
498, 165

Spectre IR (KBr) : 3410, 2970, 2880, 1725, 1665, 1615, 1500,  
1460, 1230 cm<sup>-1</sup>

20 Exemple 20 :

N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophylglycinate d'éthyle (V-Tryp-Gly-E)

La condensation de 596 mg d'hydrazide et de 226 mg de L-tryptophylglycinate d'éthyle (41h, 4°C) fournit 200 mg de V-Tryp-Gly-E, après purification sur colonne de silice en utilisant comme éluant un mélange éther-méthanol dont la proportion en méthanol sat. en NH<sub>3</sub> augmente de 4 à 14 %.

Spectre de masse : ionisation moléculaire à l'isobutane  
M<sup>+</sup> +1 1027, 1042, 1055, 1013, 983, 969

30 Exemple 21 :

N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-valinyl-L-tryptophanate d'éthyle (V-Val-Tryp-E)

A partir de 500 mg de l'hydrazide de la désacétyl-VLB et 215 mg de L-valinyl-L-tryptophanate d'éthyle on isole 215 mg de V-Val-Tryp-E pure après passage sur colonne chromatographique.

Spectre de masse : ionisation moléculaire à NH<sub>3</sub>  
M<sup>+</sup> +1 1069, 632, 617, 498, 332, 223

Exemple 22 :N-(désacétyl-0-4-vinblastinoyl-23)-L-tryptophane (V-Trypt Ac)

En appliquant le mode opératoire général mais en utilisant l'acide aminé non estérifié, on obtient la V-Trypt Ac avec un rendement de 67 %.

Spectre UV (MeOH,  $\lambda$  max, nm, log ε )

270 (4,29) ; 289 (4,18) ; 321 (ép)

Spectre IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) :

3400, 2860, 2820, 2760, 1720, 1650, 1605, 1590, 1500, 1455, 1225,

10 780.

Exemple 23 :N-(vinblastinoyl-23)-L-valinate d'éthyle

Le N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-valinate d'éthyle (100 mg) est traité par un mélange de pyridine (2,5 ml) et d'anhydride acétique (2,5 ml) sous atmosphère inerte et sous agitation pendant 24 heures. Après addition de méthanol et concentration sous vide, le résidu est repris par du dichlorométhane et lavé à l'eau sat. en NaCl. La phase organique est séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et concentrée sous vide. Le produit est purifié par chromatographie sur couche mince en utilisant comme éluant un mélange isopropanol/acétate d'éthyle/cyclohexane (40/20/40). On recueille ainsi 29 mg de N-(vinblastinoyl-23)-L-valinate d'éthyle.

Spectre de masse : ionisation moléculaire à l'isobutane :

$M^{+}+1$  925,  $M^{+}+1+14$  939,  $M^{+}+1+28$  953, 924, 907,

25 893, 882, 881, 867, 866, 392, 279

Spectre IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3480, 3430, 2970, 1740, 1690, 1615,

Spectre UV (54,2 mg/l,  $\lambda$  max, log ε ) : 263 (4,28), 288 (4,17),  
296 (4,13).

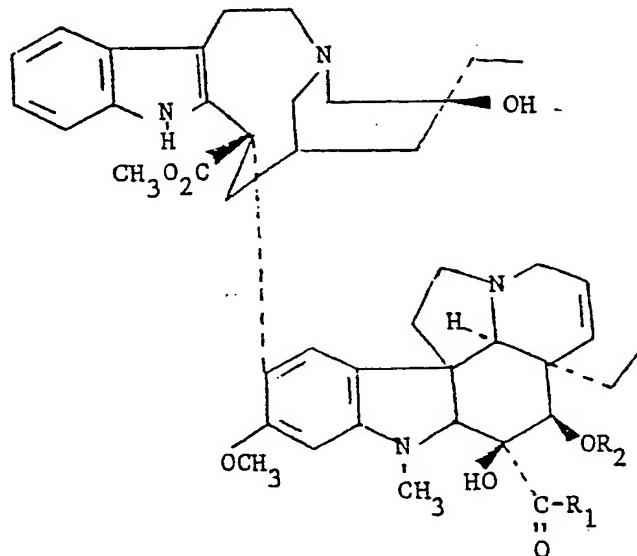
Spectre RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz, ppm)

30 9,76 (1H,s), 8,06(s), 7,52(1H, d), 7,43(1H, d), 7,20 et 7,03 (3H,m),  
6,59(s), 6,06(1H,s), 5,85(1H,dxd), 5,29(1H,d), 4,57(1H,dxd),  
3,77(3H,s), 3,61(3H,s), 2,69(3H,s), 2,02(3H,s), 1,28(3H,t),  
0,97(3H,d), 0,95(3Hd), 0,90(3H,t), 0,81(3H,t).

## R E V E N D I C A T I O N S

1. A titre de composés nouveaux, les dérivés de la vinblastine répondant à la formule générale suivante :

5



10

dans laquelle

15  $R_1$  représente un ester d'acide aminé ou de peptide, éventuellement protégé, couplé au fragment vinblastinoyl-23 par un lien amide, le peptide comprenant de 1 à 6 acides aminés différents ou identiques, et le groupe ester ramifié ou non possédant de 2 à 9 atomes de carbone ; et

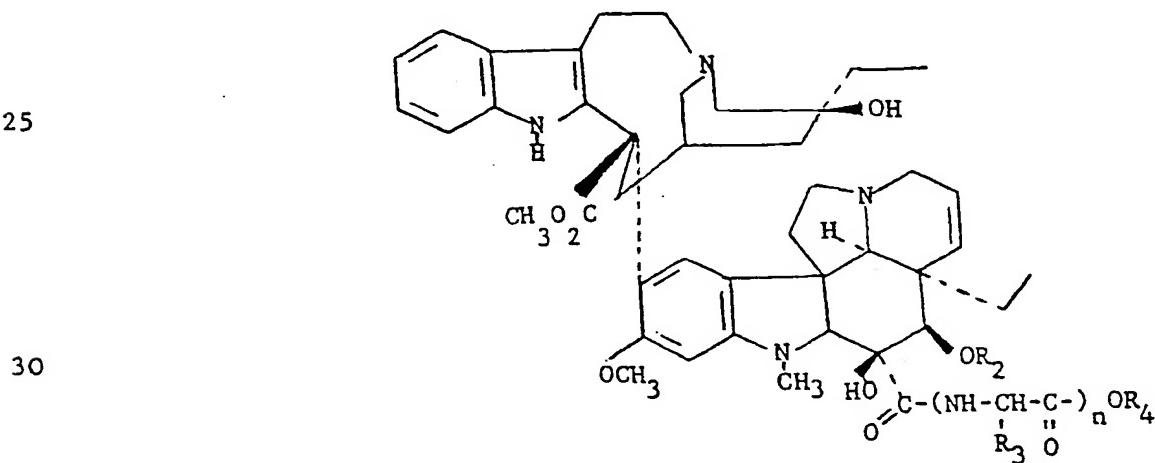
20  $R_2$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe acyle comportant de 2 à 9 atomes de carbone, ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques.

2.

Composés nouveaux de formule générale

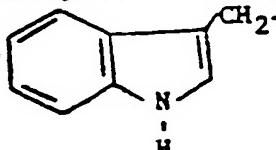
25

30

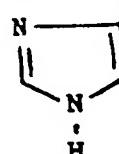


dans laquelle R<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupe acyle comportant de 2 à 9 atomes de carbone, R<sub>3</sub> représente chaque fois indépendamment, un atome d'hydrogène, un groupe alkyle ramifié ou non comportant de 1 à 8 atomes de carbone, un groupe hydroxy C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyle, amino-hydroxy C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyle, carboxy-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyle, amido C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyle, 5 guanadino C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyle, amino C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyle, thiol C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyle cystéinylique, méthyle, thiométhyl-éthyl, benzyle, hydroxybenzyle, I

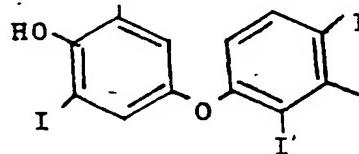
10



,



ou



15

ou R<sub>3</sub>, ensemble avec le carbone auquel il est rattaché et l'azote du groupe amide, forme un cycle azole ou hydroxyazole ; n varie de 1 à 6 et R<sub>4</sub> est un groupe benzyle ramifié ou non comportant de 1 à 8 atomes de carbone ;

15 ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques.

3. Composés suivant les revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'il s'agit du N-(désacétyl-O-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle ou de méthyle et leurs sels d'addition avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

20

4. Composés suivant les revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'il s'agit du N-(désacétyl-O-4 vinblastinoyl-23)-isoleucinate d'éthyle ou de méthyle et leurs sels d'addition avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

5.

Composés suivant les revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'il s'agit du N-(désacétyl-O-4 vinblastinoyl-23)-L-valyl-L-tryptophanate d'éthyle et les sels d'addition avec des acides pharmaceutiquement acceptables.

30

6. Composés suivant les revendications 1 à 5, caractérisés en ce qu'ils se présentent sous la forme de leurs sels d'addition 1:1 avec l'acide sulfurique.

7. Le sulfate de N-(désacétyl-O-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle.

8.

Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par les dérivés de la vinblastine suivants, éventuellement sous la forme d'un sel d'addition avec un acide minéral ou organique :

N-(désacétyl-O-4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate d'éthyle,

- N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate de méthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate de n-butyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-leucinate d'octyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-D-leucinate d'éthyle,  
5 N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-glutamate d'éthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-sérinate d'éthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate de méthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-D-tryptophanate d'éthyle,  
10 N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-alaninate d'éthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-phénylalaninate d'éthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-isoleucinate d'éthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-isoleucinate de méthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-valinate d'éthyle,  
15 N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tyrosinate d'éthyle,  
N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)- $\epsilon$ -trifluoroacétyl-L-lysinate  
d'éthyle,  
N-(désacétyl-0-4-vinblastinoyl-23)-L-valinyl-L-tryptophanate d'éthyle,  
N-(vinblastinoyl-23)-L-valinate d'éthyle.
- 20 9. Composition pharmaceutique utilisée en médecine humaine et vétérinaire pour le traitement de maladies néoplasiques, caractérisée en ce qu'elle contient un ou plusieurs dérivés définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 8.
10. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle est sous une forme d'administration dans laquelle le principe actif est présent à une dose unitaire comprise entre environ 2 et 900 mg.
- 25 11. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce que le principe actif est le N-(désacétyl-0-4  
30 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle, éventuellement sous la forme d'un sel d'addition avec un acide pharmaceutiquement acceptable.
- 35 12. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce que le principe actif est le N-(désacétyl-0-4  
vinblastinoyl-23)-L-valyl-L-tryptophanate d'éthyle, éventuellement sous la forme d'un sel d'addition avec un acide pharmaceutiquement acceptable.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce que, dans la forme d'administration parentérale, le principe actif se trouve dans un diluant pharmaceutiquement acceptable.
- 5 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce que le diluant est une solution aqueuse stérile tamponnée.
15. Procédé d'obtention des composés selon les revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 10 1) réaction de la vinblastine avec l'hydrazine anhydre pour obtenir la désacétyl-0-4 carboxhydrazide-3 vinblastine,
- 15 2) traitement de l'hydrazide obtenu avec un agent de nitrosation en milieu acide pour obtenir l'azoture d'acide correspondant,
16. 3) réaction de l'azoture d'acide avec 1 à 5 équivalents de l'ester d'acide aminé ou de peptide correspondant.
16. Procédé de préparation des composés selon les revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'azoture d'acide 0-4-désacétyl vinblastinoïque-23 est traité par 1 à 5 équivalents d'ester d'acide aminé ou de peptide approprié, ledit peptide comportant de deux à six acides aminés.
- 20 17. Procédé de préparation du N-(désacétyl-0-4-vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle, caractérisé en ce que la 0-4-désacétyl-carboxhydrazide-3 décarbométhoxy-3 vinblastine est traitée par un agent de nitrosation en milieu acide et l'azoture ainsi obtenu traité par le L-tryptophanate d'éthyle.
- 25 18. Procédé de préparation du N-(désacétyl-0-4 vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle, caractérisé en ce que l'azoture d'acide 0-4-désacétyl vinblastinoïque-23 est traité par 1 à 5 équivalents de L-tryptophanate d'éthyle.
- 30 19. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'agent de nitrosation est le nitrite de sodium en milieu chlorhydrique - méthanol.
- 35 20. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'agent de nitrosation est le nitrite de sodium en milieu acide chlorhydrique - méthanol.

21. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le couplage avec l'ester d'acide aminé ou de peptide est effectué à une température comprise entre -3 et +10°C pendant 8 à 72 h.

5 22. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que le couplage avec le tryptophanate d'éthyle est effectué à une température comprise entre -3 et +10°C pendant 8 à 72 h.

23. Composés répondant à la formule générale de la revendication 15, et ses sels d'addition, tels qu'obtenus par la 10 mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 15, 16 et 19.

24. Le N-(désacétyl-<sup>0</sup>-4-vinblastinoyl-23)-L-trypto-phanate d'éthyle ou un de ses sels d'addition, tels qu'obtenus par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 17, 18 et 20.

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Révendication concernée	
D	<p>BE - A - 813 168 (ELI LILLY AND COMPANY)</p> <p>* Revendications *</p> <p>---</p> <p>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 1979, vol. 22, no. 4 Washington, D.C. US R.A. CONRAD et al.: "Structure-activity relationships of dimeric catharanthus alkaloids.2.Experimental Antitumor Activities of N-Substituted deacetylvinblastine amide ( vindesine)sulfates<sup>1-3</sup>", pages 391-400</p> <p>* Page 393, composés 15 et 16 *</p> <p>-----</p>	<p>1,9,15</p> <p>1,9,15</p>	<p>C 07 D 519/04 A 61 K 31/395</p> <p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.)</p> <p>C 07 D 519/04</p>
			<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X: particulièrement pertinent A: arrière-plan technologique O: divulgation non-écrite P: document intercalaire T: théorie ou principe à la base de l'invention E: demande faisant interférence D: document cité dans la demande L: document cité pour d'autres raisons</p> <p>&amp;: membre de la même famille, document correspondant</p>
<input checked="" type="checkbox"/>	Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications		
Lieu de la recherche <b>La Haye</b>	Date d'achèvement de la recherche <b>08-09-1981</b>	Examinateur <b>VAN BIJLEN</b>	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**